

電気化学計測に基づく細胞・微生物チップの開発に関する研究

| | |
|-----|---|
| 著者 | 彼谷 ?敏 |
| 号 | 3206 |
| 発行年 | 2003 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/8478 |

氏 名 か 谷 高 敏

授 与 学 位 博士 (工学)

学位授与年月日 平成16年3月25日

学位授与の根拠法規 学位規則第4条第1項

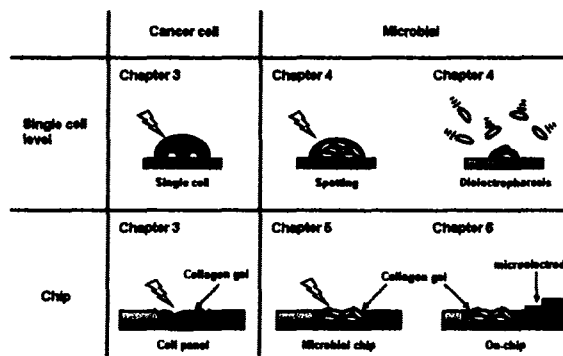
研究科, 専攻の名称 東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻

学 位 論 文 題 目 電気化学計測に基づく細胞・微生物チップの開発に関する研究

指 導 教 官 東北大学教授 末永 智一

論 文 審 査 委 員 主査 東北大学教授 末永 智一 東北大学教授 野澤 庸則
東北大学教授 熊谷 泉 東北大学教授 西澤 松彦

細胞や微生物の生体反応を理解し、これらを生物素子として工学的に応用することは極めて重要である。また様々な細胞や微生物本来の応答だけでなく、近年の遺伝子工学技術の発展に伴い環境応答生細胞の創生が現実味を帯びている今、これらの効率的な応用に必要な技術開発は不可避である。本論文は、細胞・微生物チップ作製の基盤技術開発とその電気化学的評価系の構築を目的とした。本研究では、ガン細胞や微生物（大腸菌，黄色ブドウ球菌，脱窒菌）などを対象として、単一細胞レベルでの知見に基づき、細胞・微生物チップを構築し、様々なスクリーニング系への応用を検討した。評価法にはマイクロ電極をプローブとした走査型電気化学顕微鏡(SECM)を用い、一貫して電気化学的手法により評価した。



Schematic view of the composition of each chapter in the paper.

第1章 序論

ここでは、本論文の目的と意義について述べた。まず本論文において一貫して用いた走査型電気化学顕微鏡(SECM)の特性・原理について最近の報告例も含めて詳しく説明した。また細胞・微生物チップの作製に関して、これまで提案されてきた手法について最近の動向も含めて記載した。

第2章 実験

ここでは本研究で使用した、マイクロ電極、各種微細加工基板の作製方法およびその評価について詳しく記載した。また、対象とした細胞や微生物の培養方法、測定装置などについても詳しく説明した。

第3章 ガン細胞チップの開発と抗癌剤スクリーニング

本章には、“細胞”を対象とした一連の電気化学計測に基づく検討を示した。単一ガン細胞計測は、ガン細胞の特性評価としてだけでなく、網羅的な薬剤スクリーニングを目的とする細胞パネル評価系の確立に向けた基礎実験として位置付けた。評価系には細胞呼吸活性を指標とした電気化学計測と、細胞膜構造を指標とした蛍光計測を採用した。この二つの測定における薬剤(KCN, ethyl alcohol)に対する細胞応答は、薬剤の作用機序に対応した応答を示した。これは、薬剤スクリーニングにおいて薬剤作用機序に立脚した測定の重要性を示しただけでなく、測定系の融合が新たな知見を得るために極めて有用であることを示唆している。本論文で使用してきた SECM は、これまで他測定系との融合に関する事例が頻繁に報告されているように、測定系としての柔軟性は特筆すべき点である。本論文では、厳密な同時計測を実施するまでには至らなかったが、電気化学/蛍光同時計測系が構築されることを今後に期待したい。この様な詳細な単一細胞計測を基に細胞パネルへの応用へ展開した。

薬剤スクリーニングにおいて最も重要なのは信頼性である。それは人、動物の生命に大きく影響を与えるためであり、これまでの薬剤スクリーニング開発の歴史が物語っている。本論文では現在、薬剤スクリーニング分野において篤い注目を集めているコラーゲンゲル包埋培養系に着目した。このコラーゲンゲル包埋培養系は生体内類似環境での細胞培養が可能である点や、培養が困難であるとされている摘出細胞培養が容易な点で、薬剤スクリーニング法への応用が検討されている。細胞パネルはこのコラーゲン包埋培養系を基板上の微小領域にアレイ状に配置したものであり、測定系に走査型プローブ顕微鏡である SECM を用いることで、そのマッピング能を最大限に生かした網羅的かつ迅速な薬剤スクリーニング系の構築が期待できる。ここでは、2種類の細胞(K562, K562/ADM⁺)を同一基板上に配置したものを作製し、抗癌剤 Adriamycin に対してその耐性機構に応じた応答を電気化学的に測定することに成功した。また抗癌剤濃度、培養経過時間に伴う抗癌剤効果を詳細に測定し、現行法である Succinic dehydrogenase inhibition test (SDI) 法と比較した結果は、電気化学計測による薬剤スクリーニングの妥当性を示すものであった。ここでは、細胞パネルの薬剤スクリーニングへの応用を中心に検討したが、本系は生体内類似環境下における細胞特性や異種細胞間コミュニケーションなどへの応用が現時点で十分に可能であり、生体内環境に立脚した細胞計測が今後ますます期待される。

第4章 スポット固定化法および誘電泳動法による微生物凝集体作製と薬剤スクリーニング

本章には、“微生物凝集体”を対象とした一連の電気化学計測に基づく検討を示した。本論文で対象とした微生物凝集体は $10^2 \sim 10^3$ 程度の菌数であり、これを対象とする測定は単一微生物計測に相当するものとして、微生物の基礎特性評価を行った。これまで微生物を対象とした電気化学計測では、溶液に微生物を分散させた系、微生物懸濁液を電極が配置された流路に導入する系もしくは微生物を固定化した透析膜を電極に被覆させた系の大きく分けて3つのタイプが提案されており、本系の様に基板上に固定化された極少数菌を対象とした電気化学測定はこれまでに例がない。

本章では、電気化学計測による大腸菌凝集体活性評価系を構築し、詳細な計測から大腸菌の呼吸活性に起因する電流応答を測定することに成功した。また、この呼吸活性指標の薬剤スクリーニングを実施し、各抗

生物質の最小発育阻止濃度を比較対象とすることで詳細な検討を行った。微生物を対象とした薬剤スクリーニングは、薬害(過剰投与, 耐性菌の創生...)を回避するために臨床において極めて重要視されているだけでなく、倍加時間の短い微生物を対象とすることでより迅速な一次スクリーニング法として創薬現場などにおいても応用が期待できる。しかし、我々だけでなくいくつかの研究グループも微生物活性指標の電気化学薬剤スクリーニングを検討しているが、いずれも定常期の微生物を対象としており、今後の課題としては培養過程を組み込んだ測定系の構築が必須である(第6章にて解決の糸口となる技術を示す)。また、蛍光計測などでは報告されている単一微生物計測も、現状では感度や測定条件などの問題から電気化学計測系では実現されていない。しかし定量性の高い電気化学計測で単一微生物計測が可能となれば、これまでに無い知見が得られるものと信じており、挑戦すべき重要な検討課題と思われる。

第5章 コラーゲンゲルを用いた微生物チップの作製とバイオセンシング

本章には、“微生物チップ”を対象とした一連の電気化学計測に基づく検討を示した。近年発展が目覚ましいバイオデバイス開発では動物細胞系に傾倒した傾向がみられ、微生物を対象としたバイオチップ開発に関してはその報告も数例に留まっている。しかし安価(際限なく増殖)、培養が比較的容易(動物細胞と比較して)、そして何100万種に上ると言われている種の多さは微生物を生物素子として利用するにあたっての十分な理由である。

本論文においては、微生物チップ構築にコラーゲンゲルの微小構造体を用い、対象微生物をコラーゲンゲル中に包埋的に固定化することで微生物チップを作製した。このコラーゲンゲル微小構造体を用いた微生物チップ作製はこれまでに例が無く、バイオデバイス開発における新規基盤技術である。さらに、従来から提案されてきたメディエータを用いた呼吸系酵素活性を指標とした電気化学測定系を微生物チップの評価に採用することで、これまでに無い高感度な測定を実現することとなった。この高感度な測定系に基づく微生物チップ評価により、グルコースセンシング、高感度検出、膜構造指標の菌種判定、薬剤スクリーニング、さらに代謝系酵素の発現スクリーニングなどの応用例を示した。それぞれの結果はこれまで報告されてきた結果と同等もしくは上回るものであり、微生物アレイチップの使用により網羅的な種々のスクリーニングが可能となることを示唆した。また、円錐ウェルおよび円柱微小穴内に固定化された大腸菌-コラーゲンゲル近傍の酸素還元電流、メディエータ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 酸化電流の実測値から、単一大腸菌あたりの酸素消費速度および $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 生成速度の定量解析を行い、単一大腸菌あたりの $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 生成(移動)速度 $K_{\text{ferro}}^{\text{cell}}$ を $(5.4 \pm 2.6) \times 10^{-19} [\text{mol s}^{-1}]$ と見積もった。

第6章 On-chip gene engineering と発癌物質スクリーニング

本章は、前章で提案した微生物チップをさらに“on-chip gene engineering”に応用展開させるために、一連の遺伝子工学諸操作(培養、遺伝子発現、発現解析、選択培養、回収)のチップ上への展開を検討した。遺伝子工学が広く一般的になりつつある現在では、チップ基板上における遺伝子工学操作(on-chip gene engineering)の実現は、サンプルの少量化、時間の短縮化、操作の簡略化へつながる可能性があるだけでなく、使用目的に応じた生物素子の改変が可能な次世代型バイオセンサーの開発に繋がると考える。

本章では、まず、コラーゲンゲル微小構造体による微生物チップ作製という新規基盤技術を基に、微生物培養という最も基本的且つ重要な操作のデバイスチップ上への展開について検討した(on-chip incubation)。こ

の on-chip incubation による細胞分裂現象は電気化学的に計測され、その電流応答からチップ上での分裂挙動を詳細に検討した。また、遺伝子工学において非常に重要な地位を確立している *lacZ* 遺伝子 (*lac* オペロン) を対象に、発現誘導されるβ-ガラクトシダーゼ活性を指標とした電気化学的発現解析、回収や selection 培養など on-chip engineering の実現に向けて必須の操作・技術に関しての検討を行った。微小電極を有したデバイスを測定系に適用することで、SECM 計測における煩雑な操作を無くし、極少数の大腸菌を対象としたリアルタイムモニタリングを実現した。その結果は IPTG-*lac* 系における feedback 機構の存在を想像させるものであり、これまでにこの様な応答を報告した例は極めて少なく、非常に意義深い。さらに、変異原応答性微生物として umu test 菌株 (*S. typhimurium* TA1535/pSK1002) を対象に、変異原曝露により誘発されるβ-ガラクトシダーゼ活性を電気化学的に測定することで、微生物チップによる電気化学的変異原スクリーニング法の開発を試みた。その応答は変異原濃度に応じて増加したものの、自然誘発によるバックグラウンド応答の増加により高感度な測定系の構築にまでは至らなかった。しかしこれまで数例報告されてきた呼吸活性指標の電気化学変異原スクリーニングよりも信頼性の高い応答を計測したと思われる。測定系としては on-chip incubation の適用によるチップ上での変異原処理培養の実現や、マイクロ電極一体型のデバイスの使用による変異原応答のリアルタイムモニタリングを実現した系が理想的であり、今後の課題と思われる。

論文審査結果の要旨

本論文は、細胞・微生物チップ作製の基盤技術開発とその電気化学的評価系の構築を目的としているおり、ガン細胞や微生物などを対象として、単一細胞レベルでの知見に基づき、細胞・微生物チップを構築するとともに、様々なスクリーニング系への応用に関して検討した結果をまとめたものである。

本論文は全7章より構成されている。

第1章は序論であり、ここでは、本論文の目的と意義について述べた。まず本論文において一貫して用いた走査型電気化学顕微鏡(SECM)の特性・原理について最近の報告例も含めて詳しく説明した。また細胞・微生物チップの作製に関して、これまで提案されてきた手法について最近の動向も含めて記載した。

第2章は実験項であり、本研究で使用したマイクロ電極、各種微細加工基板の作製方法およびその評価について詳しく記載した。また、対象とした細胞や微生物の培養方法、測定装置などについても詳しく説明した。

第3章では、動物細胞を一つの生物素子として捉え、様々な薬剤に対する単一細胞応答を電気化学計測および蛍光計測により測定した。また、複数種のガン細胞を同一基板上に固定化したガン細胞パネルを作製し、SECMを用いた電気化学計測による抗癌剤スクリーニングに関して述べた。

第4章では、極少数菌からなる微生物凝集体を対象として、その活性や様々な薬剤に対する応答を、SECMにより電気化学的に評価した。また、誘電泳動現象を利用することで、凝集体の作製から電気化学計測にいたる全ての操作を自作デバイス上で実現した。

第5章では、微生物を一つの生物素子として捉え、極少数菌をコラーゲンゲルにより基板上に固定化した微生物チップを作製した。この微生物チップの電気化学的評価に、電子伝達メディエータを採用することで高感度な測定系を構築し、様々なバイオアッセイを検討した。さらに、コラーゲンゲル中に固定化された微生物を対象とした定量解析を検討した。

第6章では、コラーゲンゲルにより作製された微生物チップを用いて、チップ上における培養(on-chip incubation)を検討し、固定化微生物のチップ上での増殖を電気化学的に評価した。また、IPTG-lac系における β -ガラクトシダーゼ発現の電気学計測や、発癌物質スクリーニングを行った。さらにOn-Chip Gene Engineeringに向けて選択培養操作や回収操作などについても検討した。

第7章は総括であり、論文の第2章から第6章までを要約して示した。

以上要するに、本論文は、細胞・微生物チップの作製と電気化学計測による細胞・微生物チップの評価系を確立したものであり、これらの新規基盤技術は細胞工学、バイオチップ開発に寄与することが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。